

PUBLICATION NUMBER : 2001188068
 PUBLICATION DATE : 10-07-01

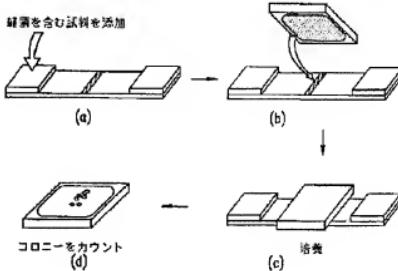
APPLICATION DATE : 28-12-99
 APPLICATION NUMBER : 11375199

APPLICANT : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD;

INVENTOR : NAKAYAMA HIROSHI;

INT.CL. : G01N 33/543 C12M 1/34 G01N 33/561
 G01N 33/569

TITLE : BACTERIA DETECTING METHOD AND
 KIT UTILIZING THE METHOD



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a bacteria detecting method with considerably improved selectivity, sensitivity, and speed in comparison with a conventional method.

SOLUTION: The method for detecting bacteria in a sample includes a process to provide an immuno-chromatograph provided with both a sample migration body with at least, a sample introducing part and bacteria capturing part and an antibody, which fixed to the bacteria capturing part, capable of specifically combining with bacteria to be detected, a process to introduce a sample to the sample introducing part and combine bacteria with the antibody, a process to grow the bacteria combined with the antibody through the use of a bacteria growth culture medium, and a process to detect the grown bacteria.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

| | | | |
|---|------------------------|---|--|
| (51)Int.Cl. G 0 1 N 33/543 C 1 2 M 1/34 G 0 1 N 33/561 33/569 | 識別記号 5 2 1 5 0 1 | F I C 0 1 N 33/543 C 1 2 M 1/34 G 0 1 N 33/561 33/569 | タ-ゴト" (参考) 5 2 1 4 B 0 2 9 5 0 1 A B B |
| 審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 9 頁) | | | |

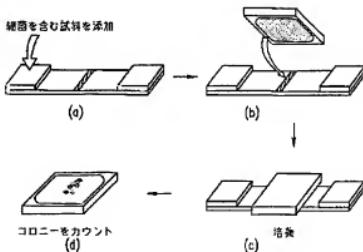
| | |
|-------------------------------------|---|
| (21)出願番号 特願平11-375199 | (71)出願人 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地 |
| (22)出願日 平成11年12月28日 (1999.12.28) | (72)発明者 中山 浩 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内 |
| | (74)代理人 100078282 弁理士 山本 秀策 |
| | F ターム (参考) 4B029 AA07 BB02 BB06 CC02 CC07 FA03 |
| | |

(54)【発明の名称】細菌検出方法およびその方法を利用したキット

(57)【要約】

【課題】従来の方法に比べて選択性、感度および迅速さの点で著しく改善された細菌検出方法を提供することを目的とする。

【解決手段】試料中の細菌の検出方法。この方法は、少なくとも試料導入部と細菌捕捉部とを有する試料添動体と、検出対象である細菌に特異的に結合し得る抗体とを備えた免疫クロマトデバイスを提供する工程であって、該抗体は該細菌捕捉部に固定化されている、工程；該試料導入部に試料を導入して該細菌を該抗体に結合させる工程；該抗体に結合した細菌を、細菌増殖培地を用いて増殖させる工程；および該増殖させた細菌を検出する工程を包含する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の細菌の検出方法であって、少なくとも試料導入部と細菌捕捉部とを有する試料泳動体と、検出対象である細菌に特異的に結合し得る抗体とを備えた免疫クロマトデバイスを提供する工程であって、該抗体は該細菌捕捉部に固定化されている、工程；該試料導入部に試料を導入して該細菌を該抗体に結合させる工程；該抗体に結合した細菌を、細菌増殖培地を用いて増殖させる工程；および該増殖させた細菌を検出する工程を包含する、方法。

【請求項2】 前記細菌増殖培地が、前記免疫クロマトデバイス上の少なくとも固定化された前記抗体を含む領域に添加される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記抗体に結合した細菌が、前記細菌増殖培地を含むデバイスに転写される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記細菌増殖培地が、細菌検出試薬を含む、請求項2または3に記載の方法。

【請求項5】 前記細菌検出試薬が、pH指示薬、発色性酵素基質、および不溶性の塗を形成し得るイオンからなる群より選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記細菌が、以下の分類のいずれかに属する、請求項1に記載の方法：ロドスピリム、クロマチア、クロロビウム、ミクソコッカス、アルカンギウム、シストバクター、ボリアンギウム、サイトファーガ、ベギアトア、シモンシエラ、リュコトリックス、アクロマチウム、ペロネーマ、スピロヘータ、スピリルム、シュードモナス、アゾバクター、リゾビウム、メチロモナス、ハロバクテリウム、腸内細菌、ヴィブリオ、バクテロイデス、ナイセリア、ヴェイヨネラ、アンモニアまたは亞硝酸化細菌、硫費代謝細菌、酸化鉄およびまたは酸化マンガン沈着細菌、シデロカブサ、メタノバクテリウム、好気性または通性嫌気性ミクロコッカス、ストレプトコッカス、嫌気性ペプトコッカス、バチルス、乳酸桿菌、コリネフォルム細菌、プロビオ菌、アクチノミセス、マイコバクテリウム、フランキア、アクチノブローネス、デルマトフィルス、ノカルデイア、ストレプトミセス、ミクロモノスボラ、リケッチア、バルトネラ、アナプラズマ、クラミディア、マイコプラズマ、およびアコレプラズマ。

【請求項7】 試料中の細菌を検出するためのキットであって、免疫クロマトデバイスと、細菌増殖培地を含むデバイスとを包含し、ここで、該免疫クロマトデバイスは、少なくとも試料導入部と細菌捕捉部とを有する試料泳動体と、検出対象である細菌に特異的に結合し得る抗体とを備え、該抗体は該細菌捕捉部に固定化されている、キット。

【請求項8】 前記細菌増殖培地を含むデバイスが、該細菌増殖培地を、前記免疫クロマトデバイス上の少なくとも固定化された前記抗体を含む領域に添加するのに適した構造である、請求項7に記載のキット。

【請求項9】 前記細菌増殖培地を含むデバイスが、前記抗体に結合した細菌を転写するのに適した構造である、請求項7に記載のキット。

【請求項10】 前記細菌増殖培地が、細菌検出試薬を含む、請求項7に記載のキット。

【請求項11】 前記細菌検出試薬が、pH指示薬、発色性酵素基質、および不溶性の塗を形成し得るイオンからなる群より選択される、請求項10に記載のキット。

【請求項12】 前記細菌が、以下の分類のいずれかに属する、請求項7に記載のキット：ロドスピリム、クロマチア、クロロビウム、ミクソコッカス、アルカンギウム、シストバクター、ボリアンギウム、サイトファーガ、ベギアトア、シモンシエラ、リュコトリックス、アクロマチウム、ペロネーマ、スピロヘータ、スピリルム、シュードモナス、アゾバクター、リゾビウム、メチロモナス、ハロバクテリウム、腸内細菌、ヴィブリオ、バクテロイデス、ナイセリア、ヴェイヨネラ、アンモニアまたは亞硝酸化細菌、硫費代謝細菌、酸化鉄およびまたは酸化マンガン沈着細菌、シデロカブサ、メタノバクテリウム、好気性または通性嫌気性ミクロコッカス、ストレプトコッカス、嫌気性ペプトコッカス、バチルス、乳酸桿菌、コリネフォルム細菌、プロビオ菌、アクチノミセス、マイコバクテリウム、フランキア、アクチノブローネス、デルマトフィルス、ノカルデイア、ストレプトミセス、ミクロモノスボラ、リケッチア、バルトネラ、アナプラズマ、クラミディア、マイコプラズマ、およびアコレプラズマ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、免疫クロマトデバイスおよび細菌増殖培地を用いて試料中の細菌を検出するための方法およびキットに関する、特に、試料から微量の細菌を高感度かつ迅速に検出し得る、環境、食品及び医療の分野で有用な方法およびキットに関する。

【0002】

【従来の技術】 従来の細菌検出方法としては、標識抗体を有する免疫クロマトデバイスを用いる方法、および培養による方法の2つが挙げられる。

【0003】 免疫クロマトデバイスを用いる細菌検出方法では、通常、検出対象細菌に結合する抗体を有する免疫クロマトデバイスに、検出対象細菌を含む試料を導入し、泳動し、そして検出対象細菌をサンドイッチ状に捕捉する。この方法では、一般に、少なくとも一種類の抗体は免疫クロマトデバイス上に固定化されており、他の抗体は泳動し得る状態で担持されている。抗体の標識物としては、色素または酵素を用い得る。標識物として色素を用いた場合は呈色により、そして酵素を用いた場合は発色性基質との酵素反応による可視化により、細菌を検出する。

【0004】培養による細菌検出方法では、細菌が増殖し得る培地成分を有する寒天培地に、適切な濃度に希釈した試料を播き、インキュベートすることにより細菌を増殖させる。細菌の増殖により形成されたコロニーの数をカウントすることにより、細菌を検出す。

【0005】しかし、これら従来の細菌検出方法は、それぞれ欠点がある。免疫クロマトデバイスを用いる細菌検出方法は、検出対象細菌に結合する抗体の親和性、および標識物を測定する検出器の感度が限定要因となり、検出限界は、試料1mlあたり細菌約1000個程度であって、満足のいくものではない。

【0006】他方、培養による細菌検出方法は、検出限界はより高いものの、細菌を含む試料をそのまま添加して培養するため、検出対象細菌以外の細菌も増殖させる可能性が高い。つまり、細菌増殖により形成されたコロニー数を計測するとき、他の細菌が増殖していると誤った検出結果をもたらす。検出対象ではない細菌の増殖を防ぐために、検出対象細菌を選択的に増殖させる培地を使用することも試みられている。しかし、その選択性は低いことが多く、検出対象細菌のみを増殖させることはしばしば困難である。細菌選択性が高い選択培地を用いる場合は、選択圧によって細菌に強いストレスが与えられるので長期間の増殖時間が必要となり、結果として、細菌の検出に時間がかかる。

【0007】以上のことから、検出対象細菌を選択的に、高感度かつ迅速に検出し得る細菌検出方法が望まれている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記問題点の解決を意図するものであり、従来の方法に比べて選択性、感度および迅速さの点で著しく改善された細菌検出方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は、検出対象である細菌に特異的に結合し得る抗体を固定化した免疫クロマトデバイスに試料を導入して、多種数の細菌を含み得る試料から検出対象細菌のみを選択的に捕捉した後、この捕捉された細菌を細菌増殖培地を用いて増殖させることにより、形成される細菌のコロニー数のカウントまたは培地中の色変化の容易な観察が可能となり、検出対象細菌のみを高感度かつ迅速に検出し得ることを見出し、これに基づいて本発明を完成させた。

【0010】本発明の方法は、試料中の細菌の検出方法であって、少なくとも試料導入部と細菌捕捉部とを有する試料泳動体と、検出対象である細菌に特異的に結合し得る抗体とを備えた免疫クロマトデバイスを提供する工程であって、該抗体は該細菌捕捉部に固定化されている、工程；該試料導入部に試料を導入して該細菌を該抗体に結合させる工程；該抗体に結合した細菌を、細菌増殖培地を用いて増殖させる工程；および該増殖させた細

菌を検出する工程を包含する。

【0011】上記細菌増殖培地は、上記免疫クロマトデバイスの少なくとも固定化された上記抗体を含む領域に添加され得る。

【0012】上記抗体に結合した細菌は、上記細菌増殖培地を含むデバイスに転写され得る。

【0013】本発明のキットは、試料中の細菌を検出するためのキットであって、免疫クロマトデバイスと、細菌増殖培地を含むデバイスとを包含し、ここで、該免疫クロマトデバイスは、少なくとも試料導入部と細菌捕捉部とを有する試料泳動体と、検出対象である細菌に特異的に結合し得る抗体とを備え、該抗体は該細菌捕捉部に固定化されている。

【0014】上記細菌増殖培地を含むデバイスは、該細菌増殖培地を、上記免疫クロマトデバイスの少なくとも固定化された上記抗体を含む領域に添加するのに適した構造であり得る。

【0015】上記細菌増殖培地を含むデバイスは、上記抗体に結合した細菌を転写するのに適した構造であり得る。

【0016】本発明の方法およびキットにおいて、上記細菌増殖培地は、細菌検出試薬を含み得、この細菌検出試薬は、pH指示薬、発色性酵素基質、および不溶性の塗を形成し得るイオンからなる群より選択され得る。

【0017】上記細菌は、以下の分類のいずれかに属し得る：ロドスピリム、クロマチア、クロロビウム、ミクソコッカス、アルカンギウム、シストバクター、ポリアンギウム、サイトファーガ、ベギアトア、シモンシア、リュコトリックス、アクロマチウム、ペロネーマ、スピロヘータ、スピリルム、シードモナス、ゾトバクター、リゾビウム、メチロモナス、ハロバクテリウム、腸内細菌、ヴィブリオ、バクテロイデス、ナイセリア、ヴェイヨネラ、アンモニアまたは亞硝酸化細菌、硫黄代謝細菌、酸化鉄および/または酸化マンガン沈着細菌、シデロカプサ、メタノバクテリウム、好気性または通性嫌気性ミクロコッカス、ストレプトコッカス、嫌気性ペトロコッカス、バチルス、乳酸桿菌、コリネフオルム細菌、プロビオン酸菌、アクチノミセス、マイコバクテリウム、フランキア、アクチノブラーネス、デルマトフィルス、ノカルディア、ストレプトミセス、ミクロモノスピラ、リケッチャ、パルトネラ、アナラズマ、クラミディア、マイコラズマ、およびアコレラズマ。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0019】本発明においては、他に特定されない限り、当該分野で公知である、細菌の培養方法および検出方法、ならびに免疫学的手法などが採用され得る。これらの手法は、市販のデバイス、抗体、標識物質などを使用して行い得る。

【0020】(検出対象試料および細菌) 本発明の細菌検出方法によれば、試料中の細菌を特異的に検出し得る。試料は、水を濁媒または分散媒として含む任意の水性試料であり得る。水性試料の例としては、尿、血液、血漿、血清、唾液、乳、汗などの体液およびそれらの分画物のような生体由来の試料；井戸水、地下水、水道水、果汁のような天然由来の試料；ならびに食料品、野菜、肉、卵などの粉粹物を水に懸濁した試料であり得る。

【0021】検出対象とされる細菌の例としては、以下の分類のいずれかに属する細菌が挙げられる： *Rhodospirillaceae* (ロドスピリルム)、*Chromatiaceae* (クロマチウム)、*Chlorobiaceae* (クロロビウム)、*Myxococcaceae* (ミクソコッカス)、*Archangiacaeae* (アルカンギウム)、*Cystobacteraceae* (シストバクター)、*Polyangiaceae* (ポリアンギウム)、*Cytophagaceae* (サイトファーガ)、*Beggiateaceae* (ベギアト)、*Simonsiellaceae* (シモンシアエラ)、*Leucotrichaceae* (リューコトリックス)、*Achromatiaceae* (アクロマチウム)、*Pelonemataceae* (ペロネーマ)、*Spirochaetaceae* (スピロヘータ)、*Spirillaceae* (スピリルム)、*Pseudomonadaceae* (シュードモナス)、*Azotobacteraceae* (アゾトバクター)、*Rhizobiaceae* (リゾビウム)、*Methyloomonadaceae* (メチロモナス)、*Halo bacteriaceae* (ハロバクテリウム)、*Enterobacteriaceae* (腸内細菌)、*Vibrionaceae* (ヴィブリオ)、*Bacteroidaceae* (バクテロイデス)、*Neisseriaceae* (ナイセリア)、*Veillonellaceae* (ヴェイヨネラ)、アノモニアまたは亜硝酸化細菌 (*Organisms oxidizing ammonia or nitrite*)、硫黄代謝細菌 (*Organisms metabolizing sulfur and sulfur compound*s)、酸化鉄および/または酸化マンガン沈着細菌 (*Organisms depositing iron and/or manganese oxides*)、*Siderocapsaceae* (シデロカプサ)、*Methanobacteriaceae* (メタノバクテリウム)、好気性または通性嫌気性 (*Aerobic or facultatively anaerobic*)、*Micrococcaceae* (ミクロコッカス)、*Streptococcaceae* (ストレプトコッカス)、嫌気性 (*Anaerobic*)、*Peptococcaceae* (ペプトコッカス)、*Bacillaceae* (バチルス)、*Lactobacillaceae* (乳酸桿菌)、コリネフォルム細菌 (*Coryneform group of bacteria*)、*Propionibacteriaceae* (プロピオノ酸菌)、*Actinomycetaceae* (アクチノミセス)、*Mycobacteriaceae* (マイコバクテリウム)、*Frankiaceae* (フランキア)、*Actinoplanaceae* (アクチノプランネス)、*Dermatophilaceae* (デルマトフィルス)、*Nocardiaceae* (ノカルディア)、*Streptomycetaceae* (ストレプトミセス)、*Micromonosporaceae* (ミクロモノスpora)、*Rickettsiaceae* (リケッチャ)、*Bartonellaceae* (バルトネラ)、*Anaplasmataceae* (アナプラズマ)、*Chlamydiaceae* (クラミディア)、*Mycoplasmataceae* (マイコプラズマ)、および *Acholeplasmataceae* (アコフレラズマ)。

【0022】(免疫クロマトデバイス) 本発明の細菌検出方法では、免疫クロマトデバイスを用いる。免疫クロマトデバイスは、少なくとも試料導入部と細菌捕捉部とを有する試料泳動体と、検出対象である細菌に特異的に結合し得る抗体とを構成要素として含む。試料泳動体の材料としては、検出対象の細菌に対する非特異的な吸着を実質的に示すことがなく、かつ試料の移動を可能にする、任意の多孔質担体を用い得る。多孔質担体の例としては、セルロース、ニトロセルロース、ガラス纖維ろ紙、スチロール樹脂、ビニル系樹脂などが挙げられる。多孔質担体の水に対する親和性が低い場合は界面活性剤を用いてもよい。試料泳動体の形状は特に限定されないが、シート状に形成されていることが好ましい。試料泳動体の試料導入部と細菌捕捉部には、連続した同一の多孔質担体を用いてもよいし、異なる材料を用いてもよい。試料導入部は、好ましくは、ガラス纖維ろ紙、セルロースである。細菌捕捉部は、好ましくは、ニトロセルロース、ガラス纖維ろ紙である。試料導入部と細菌捕捉部とを、と共にニトロセルロースで構成すると、試料の流速が著しく低くなるので、細菌捕捉部だけをニトロセルロースで構成し、試料導入部には、試料の流速がより早いガラス纖維ろ紙などを用いることが好ましい。

【0023】試料泳動体の細菌捕捉部には、試料の移動に伴う位置の変化が実質的に起きない強度で、検出対象である細菌に特異的に結合し得る抗体が固定化されている。この抗体は、検出対象の細菌に特異的に結合し得る任意の抗体であり得る。「特異的に」結合し得るとは、試料中の検出対象である細菌とは結合し得るが、同じ試料中に存在し得る他の細菌とは実質的に結合しないことをい。ここでいう「結合」とは、抗原-抗体反応による結合であり、非特異的な吸着などを含まない。

【0024】検出対象である細菌に特異的に結合し得る抗体は、当該分野で公知の方法により、適切な量で試料泳動体に固定化されるを得る。例えば、細菌捕捉部がニトロセルロースである場合、抗体を含む溶液をニトロセルロース上に滴下した後、乾燥、および洗浄することにより、抗体を非特異的に吸着させ得る。他の固定化法として、例えば、特願平8-283297号公報に記載のような糖コンジゲートを用いて、抗体をガラス涙紙などに固定化してもよい。

【0025】上記抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよく、キメラ抗体、Fab抗体、(Fab_{ab})₂抗体などの形態でもあり得る。抗体のクラスは特に限定されないが、好ましくは、IgGである。当業者は、検出対象の細菌に対応して適切な抗体を選択し得る。一定の細菌に結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体などは、当該分野で公知であり、容易に入手し得る。抗体はまた、当該分野で公知の免疫学的方法などに従って作製し得る。例えば、検出対象である細菌がサルモネラ菌である場合には、抗体として、一種類以上の抗サルモネラ菌モノクローナル抗体または抗サルモネラ菌ポリクローナル抗体を用い得る。

【0026】本発明の細菌検出方法において、捕捉した細菌を細菌増殖培地に転写せることを意図する場合、上記抗体は、試料からの細菌の捕捉およびその後の転写を効率よく行う得る範囲の結合親和力を有する。結合親和力の程度は、「力価(タイマー)」、すなわち、抗原ペプチドへの結合が観察される最大の希釈倍率を用いて表現され得る。具体的には、本発明における好適な抗体のタイマーは、1/100～1/1000程度の範囲である。

【0027】本発明の細菌検出方法で用いられる免疫クロマトデバイスは、上記試料泳動体において、細菌捕捉部に対して、試料導入部とは対反側に、吸水部をさらに含み得る。吸水部は、過剰の試料を迅速に吸収するため用いられる部分であり、優れた吸水力および給水容量を有する多孔質物質から構成される。多孔質物質の例としては、ガラス繊維ろ紙、セルロースが挙げられる。

【0028】本発明の細菌検出方法で用いられる免疫クロマトデバイスの構成を、図1に例示する。図1に示すように、細菌捕捉部102の一方の端の上に試料導入部101を、そして反対側の端の上に吸水部103を接着させることにより、試料泳動体が組み立てられる。あるいは、試料導入部101、細菌捕捉部102および吸水部103を順次配置して、試料泳動体を組立ててもよい。細菌捕捉部は、検出対象である細菌に特異的に結合し得る抗体が固定化された領域106を含む。試料泳動体は、両面テープ104に貼り付けられ、そして両面テープ104を介して、支持体105に保持される。

【0029】(細菌増殖培地) 本発明の細菌検出方法で

は、捕捉した細菌を増殖させるための細菌増殖培地をさら用いる。

【0030】細菌増殖培地は、検出対象である細菌の増殖を支持する任意の培地である。培地の成分の例としては、アンモニア塩、硝酸塩、硫酸塩、塩化物塩、リン酸塩、カリウム塩、マグネシウム塩などの無機塩；有機塩；システィンなどのアミノ酸；牛乳カゼイン、黒豆、ダイズタンパク質などの種々のタンパク質を、ペプシン、トリプシン、ペプシンなどのタンパク質分解酵素または酸で部分的に加水分解することにより得られる、種々のペプトン；グルコース、マルトース、シクロース、デンプン(例えば、溶性デンプン)などの糖；ヘモグロビンなどのタンパク質；酵母抽出物、臍臍抽出物(臍臍抽出物、肝臍臍抽出物、肺抽出物)などの抽出物；および発芽素などの増殖因子などが挙げられる。【0031】当業者は、検出対象である細菌に対応して適切な培地を選択し得る。好ましい培地の例としては、トリプテックソイプロス、ブレインハートインフェージョン血液培地、およびチョコレート培地が挙げられる。トリプテックソイプロスは、一般的な細菌および栄養要求の厳しい細菌のいずれも増殖させ得。例えば、サルモネラ菌の増殖に好適である。

【0032】トリプテックソイプロス液体培地の組成は、溶媒を水として培地1リットルあたりペプトン15g、ダイズペプトン5g、および塩化ナトリウム5g(pH7.2)であり、寒天培地の場合には、この組成にさらに寒天を約10～20g含み得る。

【0033】ブレインハートインフェージョン血液培地の組成は、溶媒を水として培地1リットルあたり牛脳エキス末7.5g、ハートエキス末8g、ペプトン10g、グルコース2g、塩化ナトリウム5g、およびリン酸一水素カリウム2.5g(pH7.2)であり、寒天培地の場合には、この組成にさらに寒天を約10～20g含み得る。ブレインハートインフェージョン血液培地は、例えば、日本製薬から「ブレインハートインフェージョンブイヨンニッスイ」として市販される。

【0034】チョコレート液体培地の組成は、溶媒を水として培地1リットルあたりペプトン15g、溶性デンプン1g、塩化ナトリウム5g、リン酸一水素カリウム4.7g、リン酸二水素カリウム0.4g、発芽素4.3g、L-システィン0.25g、およびヘモグロビン10.0g(pH7.2)であり、寒天培地の場合には、この組成にさらに寒天を約10～20g含み得る。チョコレート寒天培地は、例えば、日本製薬から「ニッスイプレート チョコレート寒天培地EX」として市販される。

【0035】細菌増殖培地は、固体および液体を含む任意の形態で得る。捕捉した細菌を細菌増殖培地に転写せることを意図する場合には、固体培地が好ましい。免疫クロマトデバイスに細菌増殖培地を添加するこ

とを意図する場合には、好ましくは、免疫クロマトデバイスの多孔質担体を通じない程度の粘度を有する粘稠な液体または柔らかいゲル状の半固体培地、または固体培地である。培地は、例えば、寒天、アガロース、アガロヘクチン、カラギーナン、ジェランガムなどから選択されるゲル化剤を含むことにより、半固体または固体の形態に調製され得る。

【0036】培地は、当該分野で公知の方法により調製される。例えば、液体培地は、水に培地成分を溶解し、必要に応じてpHを適切に調整することにより調製される。当業者は、各種の検出対象細菌に対応して適切な培地pHを選択し得る。固体培地は、液体培地を調製した後、ゲル化剤を加え、加熱してゲル化剤を溶解させた後、適切な容器に培地を分注し、ゲル化剤の融点より低い温度まで温度を下げることにより、ゲル化せ得る。細菌の繁殖を防ぐため、調製後、培地を殺菌もしくは滅菌することが好ましい。培地の殺菌条件は当該分野で公知であり、例えば、1気圧、120°Cにて15分間の高压蒸気滅菌が用いられ得る。種々の培地は、培地成分の混合物として、または調製済みの培地として市販されており、容易に入手し得る。

【0037】細菌増殖培地を含むデバイスは、細菌増殖培地を任意の形態の容器に収容して提供され得る。容器の形状の例として、プレート、ディッシュ、ビーカー、フラスコ、チューブ、セル、バイアル、ボトルなどが挙げられる。細菌増殖培地を含むデバイスは、免疫クロマトデバイス上に固定化された細菌を転写するために用い得る（この場合のデバイスを「転写用デバイス」とも呼ぶ）。転写用デバイスは、プレート、ディッシュなどのように開口部が大きい形態であって、開口部から露出した細菌増殖培地の表面が、免疫クロマトデバイス上の抗体が固定化された領域の面積よりも大きい面積の平面を有することが好ましい。転写用デバイスは、さらに、開口部を覆って細菌増殖培地の乾燥を防ぐための任意のシートを備え得る。シートは、水分を透過させない限り任意の材質および厚さで作製され得る。シートの材料の例としては、ポリエチレン、塩化ビニル共重合体、塩化ビニル酢酸ビニル共重合体などが挙げられる。透明シートをかぶせた寒天培地パッドの例を図2に示す。

【0038】他方、細菌増殖培地は、免疫クロマトデバイス上の少なくとも固定化された抗体を含む領域に添加され得る（この場合のデバイスを「添加用デバイス」とも呼ぶ）。添加用デバイスは、それぞれの形態の培地を、その添加に適した任意の形態の容器に収容して提供され得る。当業者は培地の形態などに応じて適切なデバイスを選択し得る。

【0039】細菌増殖培地のための容器の材質は、特に限定されないが、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネートのようなプラスチック；ガラス；シリコン樹脂が挙げられる。容器に収

容される試薬の容量は、免疫クロマトデバイスの大きさ、特に固定化された抗体の量を考慮して適宜設定され得、代表的には約0.1mL～約1L、好ましくは約1mL～約100mLであり得る。

【0040】（細菌検出方法およびキット）本発明の細菌検出方法では、まず、上記のような、少なくとも試料導入部と細菌捕捉部とを有する試料泳動体と、検出対象である細菌に特異的に結合し得る抗体とを包含する免疫クロマトデバイスの試料導入部に試料を導入して細菌を抗体に結合させる。試料は、免疫クロマトデバイスの試料導入部に添加されると、試料導入部から細菌捕捉部を通過する方向へと泳動する。細菌捕捉部中の抗体固定化領域に到達した検出対象細菌は、検出対象に特異的に結合し得る抗体と結合して固定化される。抗体と結合しない細菌および試料中の他の成分は、細菌捕捉部を通過して移動する。試料の泳動は、好ましくは、抗体と結合しない細菌および他の成分が実質的に細菌捕捉部に残留しなくなるのに十分な時間、行われる。

【0041】抗体に結合した細菌は、細菌増殖培地を用いて増殖させる。細菌増殖培地は、例えば、免疫クロマトデバイスの細菌捕捉部のうちの少なくとも抗体固定化領域に添加され得る。好ましい一態様においては、細菌増殖培地は、細菌捕捉部以外、特に吸水部には接触しないように添加される。このように位置選択性に細菌増殖培地を添加することにより、検出対象以外の細菌の増殖を容易に防止し得るという利点がある。他方、免疫クロマトデバイス全体に細菌増殖培地を添加することも可能であり、この場合、他の細菌を拡散させない程度に半固体または固体の培地を用い、そして細菌の検出、細菌捕捉部でのみ行なうことが好ましい。免疫クロマトデバイス全体に細菌増殖培地を添加することは、免疫クロマトデバイスが小さい場合でも操作が行い易い、および測定対象細菌の検出を自動化し易いなどの利点がある。

【0042】あるいは、免疫クロマトデバイス上の少なくとも固定化された抗体を含む領域は、液体の細菌増殖培地を含むデバイス中の当該培地に浸漬され、そしてインギュベートされ得る。このような浸漬法も、細菌増殖培地がクロマトデバイス上に「添加される」態様に含まれる。この場合、吸水部を取り外した免疫クロマトデバイスを浸漬することが好ましい。

【0043】以上のように培地が添加された免疫クロマトデバイスは、検出対象である細菌の増殖に好都合な温度（一般に、約20°C～約50°C、好ましくは約30°C～約45°Cでインキュベートされ得る。好ましくは、培地の乾燥を防ぐために、培地が添加された免疫クロマトデバイスを、水分が蒸発しにくい収容装置に入れた状態で、または多温条件を維持するための他の任意の手段を伴って、インキュベートされる。当業者は、種々の検出対象の細菌の特性に対応して、嫌気性または好気性条件を含む種々の要因について適切な培養条件を選択し得

る。

【0044】抗体に結合した細菌はまた、細菌増殖培地を含むデバイスに転写され、転写の過程で、または転写後にインキュベートされ得る。細菌が固定化された後には、免疫クロマトデバイスの細菌捕獲部のうちの少なくとも抗体固定化部を含む領域と、転写用デバイス中の細菌増殖培地の表面とを接触させ、次いで抗体固定化部を含む領域と、細菌増殖培地を含む転写用デバイスとを引き離す。これにより、検出対象細菌は、免疫クロマトデバイス上に固定化された抗体から剥がれて、細菌増殖培地に転写される。免疫クロマトデバイスの細菌捕獲部のうちの少なくとも抗体固定化領域と細菌増殖培地の表面とは、例えば、細菌増殖培地を含む転写用デバイスを免疫クロマトデバイスの上に反転して重ねることにより、または逆に免疫クロマトデバイスを転写用デバイスの上に反転して重ねることにより、接触させ得る。免疫クロマトデバイスを、デバイス中の細菌増殖培地の表面と接触させた状態のままインキュベートを行っても、転写後にインキュベートを開始してもよい。免疫クロマトデバイスを、デバイス中の細菌増殖培地の表面と接触させた状態のままインキュベートする場合、接触（すなわち、インキュベート）を行う時間は、代表的には約30分間以上、好ましくは約60分間～12時間であり得る。転写後にインキュベートを行う場合、接触時間は、代表的には約10秒間以上、好ましくは約10秒間～10分間であり得る。インキュベート条件は、上記に準ずる。転写用デバイスを用いる場合、検出対象でない細菌を含む可能性がある吸水部は、細菌増殖培地と接触させないことが好ましい。

【0045】次いで、増殖させた細菌が検出される。細菌の検出は、形成されるコロニーの数をカウントすること；または細菌増殖培地に細菌検出試薬に由来する細菌増殖培地の星密度の測定によって行なわれ得る。細菌検出試薬は予め細菌増殖培地に含まれていてもよく、上記インキュベート終了後に添加されてもよい。好ましくは、細菌増殖培地は、予め細菌検出試薬を含む。本明細書中では、「細菌検出試薬」とは、検出対象細菌の作用により外部から観測し得る変化を与える物質であり、例としては、pH指示薬、発色性酵素基質、不溶性の塗を形成し得るイオンなどが挙げられる。pH指示薬の例としては、プロムフェノールブルー、フェノールレッドなどが挙げられる。発色性酵素基質の例としては、ペルオキシダーゼの基質、β-ガラクトシダーゼの基質（例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド、すなわちx-gal）などが挙げられる。例えば、検出対象細菌がサルモネラ菌である場合、サルモネラ菌は硫化水素を放出するため、細菌検出試薬は、鉄イオン、銀イオンなどの硫化水素検出指示薬であり得る。培地に予め添加する場合、細菌の成育を妨げない（毒性のない）イオンであることが好ましい。細菌検

出試薬を用いることにより、コロニー形成が確認できな程度の極少量の細菌を可視化することができ、コロニーの数をカウントするよりも容易にかつ迅速に細菌を検出し得る。試料中の検出対象細菌は、抗体検出試薬による細菌増殖培地の着色または変色に基づいて、目視または吸光光度計での測定などにより検出し得る。

【0046】本発明のキットは、上記の免疫クロマトデバイスと、細菌増殖培地を含むデバイスとを備える。本発明のキットはさらに、細菌検出試薬を備え得る。細菌検出試薬は、細菌増殖培地を含むデバイスに予め混合されていてもよいし、免疫クロマトデバイスまたは細菌増殖培地を含むデバイスとは異なる容器に収容されてもよい。本発明のキットの各成分は、通常、雑菌の混入を避けるために包装により密封され、適切な使用説明書と共に梱包されて提供され得る。

【0047】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0048】＜実施例＞以下に、本発明の細菌検出法を利用する、サルモネラ菌検出の具体例を示す。

【0049】（サルモネラ菌抗体の固定化）約5cm×約0.9cmのニトロセルロース（ミリポア社製）の短辺の端から2cmの上に、抗サルモネラ菌ポリクローナル抗体1mg/mLを含有するリン酸緩衝生理食塩水（PBS）溶液1.0μlを、ニトロセルロースの長辺に対して垂直方向に端から端まで幅約1mmのライン状に滴下し、その後、40℃20分間遮光状態で乾燥することにより、抗サルモネラ菌ポリクローナル抗体を固定化した。用いた抗サルモネラ菌ポリクローナル抗体の、サルモネラ菌に対するタイマーは、1/2000であった。得られた固定化ニトロセルロースを、1%スクリムミルクを含有する0.1Mトリス溶液（pH8.2）に浸潤し、30℃30分間シェイカーにて振盪することにより、ブロッキングした。ブロッキング後、ニトロセルロースを、0.1Mトリス溶液（pH8.2）で30℃30分間に3回洗浄した後、インキュベーター内で40℃にて4時間乾燥させた。乾燥後の抗体固定化ニトロセルロースを、細菌捕獲部の多孔質担体として用いた。

【0050】（免疫クロマトデバイスの構成）試料導入部101および吸水部103の多孔質担体としては、それぞれ、約2cm×約0.9cmのガラス繊維片を用いた。

【0051】約7cm×約0.9cmの両面テープ104を、約7cm×約0.9cmのポリビニル板の支持体105の表面に張った。両面テープ104の反対側に、上記の抗サルモネラ菌抗体固定化ニトロセルロース（細菌捕獲部102）を接着し、次いでこのニトロセルロースの両端に、それぞれ試料導入部101および吸水部103を、図1に示す配置と同様にして、ただし、試料導

入部101の一部と細菌捕捉部102の一部、および吸水部103の一部と細菌捕捉部102の一部のがかかるように接着させることによって試料導入部100を構成し、免疫クロマトデバイスを作製した。試料導入部は上流側になり、吸水部は下流側になる。

【0052】(サルモネラ菌分散液の泳動)サルモネラ菌分散液200μl(1、5、10、100、または1000細胞/m¹)を、上記で作製した免疫クロマトデバイスの試料導入部101に添加し、5分間放置した。この間に、添加された分散液は、試料導入部101から、細菌捕捉部102中の抗体固定化部106を通過して吸水部103へと泳動した。

【0053】(サルモネラ菌の培養)サルモネラ菌分散液を試料導入部に添加して5分後の免疫クロマトデバイス(図3(a))に、図2に示す培養パッド(本発明における乾写用デバイス)の透明シートを剥がし、反転させて、寒天培地の表面が細菌捕捉部を含む領域に重なるように培養パッドを装着した(図3(b))。図2に示す培養パッドは、厚さ5mmのポリスチレン製の2cm×2cmの培養プレートに、2mlのトリプタックソイプロス寒天培地を含んでいた。この培養パッドは、日水製薬から、ニッスイプレートトリプトソーサ固体寒天培地(SCR寒天培地:溶媒を水として培地1リットルあたりペプトン15g、ダイズペプトン5g、および塩化ナトリウム5g、および寒天15g(pH7.2))を含むプレートとして市販される。

【0054】次いで、培養キットと免疫クロマトデバイスを重ねた状態のまま、40°Cにて5時間、好気条件下でインキュベーションした(図3(c))。インキュベーション終了後、培養キットを、免疫クロマトデバイスから剥がすことにより、増殖した細菌を寒天培地に乾写した。寒天培地上のコロニー数を目視によりカウントした(図3(d))。その結果、サルモネラ菌分散液の

濃度が1細菌/mlである場合まで検出可能であった(図4)。このように、本発明の方法によれば、選択的に、非常に高感度でかつ迅速に細菌を検出し得る。

【0055】

【発明の効果】本発明の細菌検出方法を用いることにより、検出対象細菌を、選択的に、高感度かつ迅速に高い信頼度で検出し得る。本発明により、環境測定、食品管理測定及び医療診断の分野で有用な高性能の細菌検出キットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明で用いられる免疫クロマトデバイスの構成図である。

【図2】図2は実施例で用いられた培養パッドを示す模式図である。

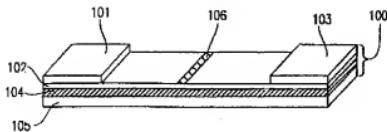
【図3】図3は本発明の方法による細菌検出の作業プロセスを示す模式図である。(a)は、細菌を含む試料を添加した免疫クロマトデバイスを示す。(b)は、細菌を含む試料を泳動した後の免疫クロマトデバイスに、培養パッドを装着する操作を示す。(c)は、免疫クロマトデバイスの少なくとも抗体固定化領域と、培養パッドに含まれる寒天培地とを接触させた状態で培養することを示す。(d)は、培養後、免疫クロマトデバイスから剥がした寒天培地上に形成されたコロニーのカウントを示す。

【図4】本発明の実施例によるサルモネラ菌の検出感度を示すグラフである。

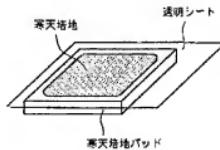
【符号の説明】

- 101 試料導入部
- 102 細菌捕捉部
- 103 吸水部
- 104 両面テープ
- 105 支持体
- 106 抗体固定化領域

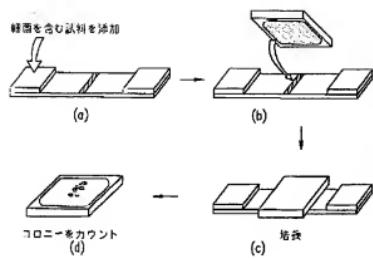
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

